



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

| | |
|--------------------------|--|
| Title 論文題目 | Increase in myocardial infarct size by CKD is prevented by continuous erythropoietin receptor activation via restoration of protective signals and malate-aspartate shuttle. (持続的エリスロポエチン受容体刺激は、心筋細胞保護シグナルとリンゴ酸アスパラギン酸シャトルの障害を修復することにより慢性腎臓病による心筋梗塞サイズの増大を予防する) |
| Author(s) 著 者 | 西沢, 慶太郎 |
| Degree number 学位記番号 | 甲第 2899 号 |
| Degree name 学位の種別 | 博士 (医学) |
| Issue Date 学位取得年月日 | 2016-03-31 |
| Original Article 原著論文 | |
| Doc URL | |
| DOI | |
| Resource Version | |

学位論文の内容の要旨

| | | | |
|--|------------|-----|---------|
| 報 告 番 号 | 甲 第 2899 号 | 氏 名 | 西 沢 慶太郎 |
| <p>Increase in myocardial infarct size by CKD is prevented by continuous erythropoietin receptor activation via restoration of protective signals and malate-aspartate shuttle. 持続的エリスロポエチン受容体刺激は、心筋細胞保護シグナルとリンゴ酸アスパラギン酸シャトルの障害を修復することにより慢性腎臓病による心筋梗塞サイズの増大を予防する</p> <p>研究目的</p> <p>近年、慢性腎臓病と心血管疾患が相互に関連してそれぞれの病態を増悪させることが明らかになっており、心腎連関と呼ばれている。実際、腎機能の低下は、心血管イベントや死亡を有意に増加させること、および心筋梗塞後の有害事象と密接に関連することが報告されている。梗塞サイズは心筋梗塞後の予後規定因子であるが、動物モデルにおいて慢性腎臓病が心筋梗塞サイズを増大させることが報告されている。その分子機構は明らかではないが、我々は最近、慢性腎臓病では心筋保護に重要な情報伝達系である虚血再灌流後の Akt 活性化が減弱していることを報告した。また、慢性腎臓病により骨格筋のインスリン抵抗性を伴う代謝変化が誘導されることも報告されている。しかし慢性腎臓病が心筋代謝に与える影響や心筋代謝と保護シグナルの関連については明らかではない。</p> <p>持続的なエリスロポエチン(EPO)受容体刺激薬であるエポエチンベータペゴル(continuous erythropoietin receptor activator; CERA)は慢性腎臓病に伴う貧血の治療に広く使用されている。また、EPO 受容体は心筋細胞にも存在し、その刺激は Akt のミトコンドリア移行による心筋細胞保護を誘導すること、骨格筋のインスリン抵抗性を改善することが報告されている。そこで本研究では、「持続的な EPO 受容体刺激は慢性腎臓病による細胞保護シグナルと心筋代謝の障害を修復することで心筋梗塞サイズ増大を抑制する」との仮説をたて、その検証を試みた。</p> <p>研究方法</p> <p>〔実験 1〕 持続的 EPO 受容体刺激が慢性腎臓病による心筋梗塞サイズ増大に与える影響の検討</p> <p>8 週齢の雄性 Sprague Dawley ラットを用いて 5/6 腎摘出術による慢性腎臓病モデルを作成した(subtotal nephrectomy; SNx 群)。また開腹手術のみを行った Sham 群を設けた。手術 5 週後に麻酔調節呼吸下に開胸し、左冠動脈前下行枝を 20 分間結紮、2 時間再灌流し、心筋梗塞を作成した。心臓を摘出し、冠動脈を再結紮後に蛍光ポリスチレンビーズを大動脈から冠動脈へ投与することで虚血域を同定した。心室をスライスして梗塞領域を triphenyltetrazolium 染色にて同定し、画像解析装置を用いて左室体積、虚血</p> | | | |

域体積、梗塞領域体積を算出した。心筋梗塞量は虚血域に対する百分率(%IS/AR)として表した。

プロトコール 1 (慢性投与実験) : 5/6 腎摘術もしくは Sham 手術 1 週間後から CERA (0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$) または vehicle を週 1 回、4 週間にわたって皮下投与した。

プロトコール 2 (急性投与実験) : 5/6 腎摘術もしくは Sham 手術 5 週間後、心筋梗塞作成前日に CERA (0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$) または vehicle を単回投与した。

プロトコール 3 (瀉血実験) : 心筋梗塞作成前に 10 ml/kg の血液を 20 分間かけて瀉血し、同量の生理食塩水を投与する瀉血群と瀉血を行わない対照群を設けた。

〔実験 2〕慢性腎臓病及び持続的 EPO 受容体刺激が Akt 活性化に与える影響の検討

実験 1 のプロトコール 1 と同様に Sham 群及び SNx 群に対して CERA または vehicle を慢性投与した。手術 5 週後に麻酔調節呼吸下を開胸し、左冠動脈前下行枝を 20 分間結紮後に再灌流した。虚血前及び再灌流 5 分後に虚血域から採取した心筋組織を凍結保存し、ホモゲナイズ後に Ser473 リン酸化 Akt、total Akt、Ser9 リン酸化 glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β)、total GSK3 β 、リン酸化 p70s6K、total p70s6K、PTEN、mechanistic target of rapamycin complex 2 (mTORC2) の構成蛋白(mTOR、Rictor、Sin1、Deptor)、PHLPP-1 の蛋白量をウェスタンブロット法により定量した。

〔実験 3〕慢性腎臓病及び持続的 EPO 受容体刺激が心筋代謝に与える影響の検討

実験 1 のプロトコール 1 と同様に Sham 群及び SNx 群に対して CERA または vehicle の慢性投与を行い、手術から 5 週後に麻酔調節呼吸下を開胸し心筋組織を採取した。キャピラリー電気泳動-質量分析装置(CE-TOFMS および CE-MS/MS)を用いてメタボローム解析を行い 116 種の代謝物質を測定した。測定データは自動積分ソフトウェア (MasterHands および MassHunter)を用い、主成分分析は SampleStat を用いて解析した。

〔実験 4〕リンゴ酸アスパラギン酸シャトル(malate-aspartate shuttle ; MAS)抑制が Akt 活性化に与える影響の検討

10%牛血清添加 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)中で H9c2 心筋芽細胞を培養した。培地を血清未添加の DMEM と交換し、24 時間後に MAS 阻害薬である aminooxyacetate (AOA、5 mM)を添加した。AOA 添加 45 分後に insulin-like growth factor-1 (IGF1、50 nM)もしくは vehicle を添加し 15 分間培養して細胞を採取し、ホモゲナイズ後に細胞質分画とミトコンドリア分画に分け、Ser473 リン酸化 Akt 及び total Akt の蛋白量をウェスタンブロット法にて定量した。

研究成績

〔実験 1〕

プロトコール 1 (慢性投与実験) : SNx 群では Sham 群と比較して血清クレアチニン値は上昇(0.83 ± 0.05 vs. 0.34 ± 0.02 mg/dl)、ヘモグロビン濃度は低下していた(14.2 ± 0.2 vs. 17.5 ± 0.2 mg/dl)。SNx 群に対する CERA 慢性投与は、ヘモグロビン濃度を有意に改善したが(16.4 ± 0.7 mg/dl)、血清クレアチニン値には影響を与えなかった(0.79 ± 0.07 mg/dl)。%IS/AR は Sham 群で $43.9 \pm 2.2\%$ であったのに対し、SNx 群では $60.0 \pm 4.0\%$ と有意に増大していた。SNx 群に対する CERA 慢性投与は、Sham 群と同程度まで %IS/AR を縮小した($36.9 \pm 3.9\%$)。%IS/AR とヘモグロビン濃度は有意な負の相関を示した($r = -0.55$ 、

p<0.05)。

プロトコル 2 (急性投与実験): プロトコル 1 と同様に%IS/AR は SNx 群で Sham 群と比較して有意に増大していたが(56.1±4.7 vs. 37.6±2.2%)、SNx 群に対する CERA の急性投与は%IS/AR に影響を与えなかった(58.1±3.0%)。

プロトコル 3 (瀉血実験): 瀉血群では SNx 群と同程度までヘモグロビン濃度が低下していたが(13.8±0.2 mg/dl)、瀉血群と対照群の%IS/AR に有意な差はなかった(47.4±5.2 vs. 42.5±2.3%)。

[実験 2]

Ser473 リン酸化 Akt、リン酸化 p70s6K 及び Ser9 リン酸化 GSK3βの蛋白量は、虚血前及び再灌流 5 分の時点で Sham 群と比較して SNx 群で低下していた。SNx 群における CERA の慢性投与は、虚血前の Ser473 リン酸化 Akt、リン酸化 p70s6K 及び Ser9 リン酸化 GSK3βの蛋白量に影響を与えなかったが、再灌流 5 分の時点では Sham 群と同程度まで増加させた。虚血前の PTEN、mTORC2 構成蛋白及び PHLPP-1 の蛋白量は各群で同様であった。

[実験 3]

測定した 116 種の代謝物質中、100 種が検出可能であった。主成分分析の結果、第一主成分(寄与率: 33.9%)により Sham 群と SNx 群を、第四主成分(寄与率: 7.2%)により SNx 群における vehicle 群と CERA 群を層別可能であった。第一主成分の因子負荷量の上位および下位の代謝物を定量的に解析した結果、グルコース 6 リン酸(G6P)とグルコース 1 リン酸(G1P)が SNx 群において Sham 群と比較して低値であったが、CERA の慢性投与は SNx 群及び Sham 群の G6P 値及び G1P 値に影響を与えなかった。一方、第四主成分の因子負荷量の最上位はアスパラギン酸、最下位はリンゴ酸であった。SNx 群では MAS 活性の指標であるリンゴ酸/アスパラギン酸比が Sham 群と比較して 1.6 倍に上昇し、MAS 活性の低下が示唆された。CERA の慢性投与は Sham 群のリンゴ酸/アスパラギン酸比に影響を与えなかったが、SNx 群におけるリンゴ酸/アスパラギン酸比を Sham 群と同程度まで低下させた。

[実験 4]

IGF1 投与は vehicle 投与と比較してミトコンドリア分画における Ser473 リン酸化 Akt の蛋白量を増加させた。AOA は単独では Ser473 リン酸化 Akt の蛋白量に影響を及ぼさなかったが、IGF1 による Ser473 リン酸化 Akt の増加を抑制した。

考察

虚血プレコンディショニングによる心筋梗塞サイズ抑制効果と虚血再灌流後の Akt-Ser473 リン酸化の程度に密接な関係があること、再灌流時の mTOR 阻害薬投与による Akt 活性化抑制により心筋梗塞サイズが増大することから、再灌流後の Akt 活性化が虚血再灌流障害を抑制することが示されてきた。本研究では SNx 群における虚血再灌流後の Akt-Ser473 リン酸化と下流の p70s6K 及び GSK3β-Ser9 リン酸化が低下しており、慢性腎臓病により再灌流後の Akt 活性化が障害されることが示唆された。SNx 群における CERA の慢性投与は、心筋梗塞サイズ及び再灌流後の Akt-Ser473 リン酸化レベルを Sham 群と同程度まで回復させた。以上より CERA の慢性投与は慢性腎臓病による再

灌流後 Akt 活性化障害を修復し虚血再灌流障害耐性を回復させたと考えられた。一方、SNx 群における CERA 慢性投与はヘモグロビン濃度を Sham 群と同程度まで回復させ、心筋梗塞サイズとヘモグロビン濃度が負の相関を示した。しかし、瀉血によって SNx 群と同程度までヘモグロビン濃度を低下させても心筋梗塞サイズの増大は認めず、貧血の改善が CERA 慢性投与による心筋梗塞サイズ縮小の原因である可能性は否定的であった。また、虚血再灌流前の CERA 単回投与は心筋梗塞サイズに影響を与えず、梗塞縮小をもたらすレベルの EPO 受容体活性化は単回投与では得られないことが示された。

メタボローム解析の結果、慢性腎臓病の心筋では解糖系の障害と MAS 活性の低下が観察された。しかし CERA の慢性投与は解糖系の障害は修復せず MAS 活性のみを回復させたことから、心筋 MAS 活性が心筋虚血再灌流障害に対する受攻性と関連することが示唆された。心筋梗塞サイズに与える MAS 活性抑制の影響は時相により異なる可能性がある。摘出灌流心において、虚血前及び再灌流後短時間のみの MAS 活性の抑制は心筋梗塞サイズをむしろ縮小すると報告されている。これは、再灌流後の緩徐な代謝の回復は、急速かつ過剰な酸化ストレス産生や細胞内カルシウム過負荷を軽減し、再灌流時の細胞死を抑制するという過去の報告を支持する。一方、虚血前から再灌流 2 時間後までの持続的な MAS 活性抑制は、心筋梗塞サイズを増大させると報告されており、本研究の結果と一致する。

Akt の Ser473 残基は、mTORC2、PHLPP-1 によりそれぞれリン酸化、脱リン酸化される。しかし、mTORC2 構成蛋白及び PHLPP-1 の蛋白量は CERA 慢性投与の有無にかかわらず Sham 群と SNx 群で同等であった。一方、H9c2 細胞を用いた検討では、MAS 阻害薬である AOA 前投与は IGF1 によるミトコンドリア Akt-Ser473 リン酸化を抑制した。ミトコンドリア Akt の Ser473 リン酸化による活性増加は、虚血再灌流障害による細胞死の主要な機序であるミトコンドリア透過性遷移孔開口を抑制する。したがって、慢性腎臓病による MAS 活性低下は、再灌流時のミトコンドリア Akt リン酸化障害を誘導して虚血再灌流障害に対する受攻性を亢進させると考えられる。この仮説は、ミトコンドリア脱共役により過剰産生される活性酸素が Akt/GSK3 β 情報伝達系を抑制するという過去の知見と一致する。

CERA はエポエチンベータを polyethylene glycol 化することにより血中半減期を延長させ、EPO 受容体をより持続的に刺激することを可能にした製剤である。これまでに 5/6 腎摘出慢性腎臓病モデルにおいて Nox4 発現低下や eNOS リン酸化亢進を介して血管内皮障害を軽減させることや、p27 発現低下・NRP1 発現増加を介して糖尿病性腎症の進展を抑制する効果が報告されている。本研究結果は、CERA 慢性投与が慢性腎臓病における細胞保護シグナルの障害を回復させうることを示したこれらの報告と一致する。

結論

持続的な EPO 受容体刺激は、慢性腎臓病による虚血再灌流後の Akt 活性化障害を修復し、心筋梗塞サイズの増大を予防する。その Akt 活性化障害修復には、リンゴ酸アスパラギン酸シャトルの回復が関与している可能性がある。

論文審査の要旨及び担当者

(平成 28 年 3 月 31 日授与)

| | | | |
|---------------|-------------|-------------|--------|
| 報告番号 | 甲第 2899 号 | 氏 名 | 西沢 慶太郎 |
| 論文審査 担 当 者 | 主査 教授 三浦 哲嗣 | 副査 教授 堀尾 嘉幸 | |
| | 委員 教授 當瀬 規嗣 | 委員 教授 宮本 篤 | |

| | |
|-------------|--|
| 学位論文 の題名 | <p>Increase in myocardial infarct size by CKD is prevented by continuous erythropoietin receptor activation via restoration of protective signals and malate-aspartate shuttle.</p> <p>(持続的エリスロポエチン受容体刺激は、心筋細胞保護シグナルとリンゴ酸アスパラギン酸シャトルの障害を修復することにより慢性腎臓病による心筋梗塞サイズの増大を予防する)</p> |
| 結果の要旨 | <p>本研究は、急性心筋梗塞での細胞障害を慢性腎臓病（CKD）が拡大させる原因とその対策の一端を明らかにすべく、CKDが心筋細胞保護シグナルならびに心筋代謝に与える影響と、それらに対する持続的なエリスロポエチン（EPO）受容体刺激の効果について検討したものである。ラットのCKDモデルにおける心筋のメタボローム解析ならびに細胞保護シグナル分子解析により、CKDが心筋リンゴ酸アスパラギン酸シャトル（MAS）活性を障害し、再灌流時の細胞保護シグナルであるAkt活性化を抑制すること、また持続的なEPO受容体刺激がそれらの障害を修復し、心筋梗塞サイズの増大を予防することが明らかにされた。さらに培養心筋細胞を用いた実験より、MAS活性障害がミトコンドリアにおけるAkt活性化の障害をもたらすことが示された。本研究は、CKDが心筋梗塞サイズを拡大する機序に心筋代謝障害と関連した細胞保護シグナルの破綻があることを初めて明らかにするとともに、その治療に持続的EPO受容体刺激が有用であることを示したものである。よって本研究は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。</p> |